

Extracción de ADN usando métodos mínimamente invasivos en *Xenarthra* orden Pilosa, una contribución a su conservación

DNA extraction using minimally invasive samples in *Xenarthra* order Pilosa, a contribution to their conservation

Yuly Marcela Salazar-Moscoso¹, Juliana Martínez-Garro^{1*}, Pablo Andrés Guzmán-González¹, Tinka Plese²

Resumen

Los *Xenarthra* son un grupo de mamíferos, de gran importancia histórica y ecológica, originados en Suramérica. La implementación de técnicas en genética molecular en estos animales está en aumento y para ello, los métodos de muestreo mínimamente invasivos son una herramienta exitosa para el monitoreo genético. En esta investigación se comparó la calidad y cantidad de ADN obtenido de sangre, tejidos, saliva, pelos y heces, usando dos kits comerciales: PrepFiler™ y GeneJET™. La concentración, pureza e integridad del ADN fueron evaluadas usando espectrofotometría y electroforesis. Se usó una ANOVA de dos factores mezclados y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para comparar los diferentes métodos de extracción de ADN y a través de las diferentes muestras biológicas. El mayor rendimiento de ADN fue obtenido para las muestras de tejido con el kit PrepFiler™, con una concentración media de 5,25 ng/μL, una pureza de 1,87 y una banda definida en la electroforesis. Sin embargo, no recomendamos el uso de estas muestras en animales vivos. El ADN obtenido de saliva con el kit PrepFiler™ ofreció resultados similares en términos de concentración (media 3,56 ng/μL), pureza de 1,85 e integridad; además, la prueba de comparación de Tukey mostró que no hay diferencias entre las muestras de saliva y sangre ($p = 0,01028$); la obtención de muestras de saliva requiere menos intervención en los animales. Por esta razón, se concluye que la extracción de ADN usando el kit PrepFiler™ en muestras de saliva es la mejor opción para extracción de ADN de calidad en las especies estudiadas.

Palabras claves: ADN, Bradypodidae, genética, integridad de ADN, Myrmecophagidae

Abstract

Xenarthrans are a group of mammals of great historical and ecological importance originated in South America. The implementation of molecular genetics techniques in these animals are on the rise with the promise of expanding our knowledge. The minimally invasive sampling methods are a success tool for genetic monitoring in conservation and we probe that could be used for future studies in xenarthrans. We compared the quality and quantity of DNA extracted from blood, tissue, saliva, feces, and hair using two commercial extraction kits: PrepFiler™ and GeneJET™. DNA concentration, purity and integrity were determined using Spectrophotometry, and electrophoresis, respectively. A two-factor mixed ANOVA and Tukey Multiple Comparison Test were used to compare mean DNA concentrations between DNA extraction methods and across biological sample types. The highest yields were of DNA obtained from tissue sample with PrepFiler™ kit, with means in amount (5.25 ng/μL) and purity (1.87) higher than the other samples, and

¹. Universidad CES, Medellín, Colombia.

². Fundación AIUNAU, Caldas, Antioquia, Colombia.

* Autor para correspondencia: <jmartinezg@ces.edu.co>

clear and integrated bands on the electrophoresis gel. However, we cannot recommend the use of this sample in live animals. The DNA obtained from saliva with the extraction kit PrepFiler™ offers similar results in terms of amount (mean 3.56 ng/ μ L), purity (1.85) and integrity of the DNA, and the Tukey comparison shown than between saliva and blood does not exist significant differences ($p = 0.1028$), and the obtainment of saliva samples requires less intervention to the animal. For this reason, we concluded DNA extraction using the PrepFiler™ in saliva samples is the best option for extracting high quality DNA in studied species.

Keywords: DNA, Bradypodidae, DNA integrity, Genetic, Myrmecophagidae

INTRODUCCIÓN

Los xenartros (Gardner, 2008) constituyen un superorden de mamíferos que, de acuerdo con su registro fósil, son originarios de Suramérica y se distribuyen por todo el continente desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina (Abba et al., 2012; Wilson y. Mittermeier, 2018). Este superorden comprende tres grupos vivientes, los perezosos (*Pilosa*), los hormigueros (*Vermilingua*) y los armadillos (*Cingulata*), los cuales se dividen en 14 géneros y 31 especies identificadas (Gaudin, 2003). Estos animales son de gran importancia histórica y ecológica para el continente por su proceso evolutivo y su estado de conservación, pero no han sido lo suficientemente estudiados debido a su naturaleza críptica.

El uso de técnicas en genética molecular para responder preguntas en biología de la conservación y ecología del comportamiento está en aumento. Tal es el caso de los estudios de taxonomía filogenética, en los que el uso de marcadores moleculares ha permitido identificar individuos, especies y poblaciones (Avice, 1989). La realización de estos procedimientos moleculares requiere de ADN de alta calidad (concentración adecuada, alta pureza e integridad), lo cual depende del tipo de muestra y del método de extracción usado (Blanco-Jarvio et al., 2014). En los últimos años, para el monitoreo genético, los métodos de muestreo mínimamente invasivos han evolucionado, dando la ventaja de generar datos sin tener que capturar el animal, ni manipularlo y en algunos casos ni siquiera observarlo (Carroll et al., 2018).

Los diferentes métodos usados para extraer ADN no son usualmente utilizados para muestras en organismos específicos y deben analizarse y ajustarse a las características de cada caso. Existen pocos

estudios acerca de xenartros donde usen muestras de animales vivos (Barros et al., 2003); otros, como el llevado a cabo por Coimbra et al. (2017), usaron un amplio rango de muestras como hígado, músculo, sangre, pelos o muestras de colecciones de museos; sin embargo, para obtener alguna de las muestras usadas en estos estudios, no solo se requiere la captura e inmovilización del animal, sino también gastos en tiempo y dinero, lo cual podría ser optimizado conociendo la eficiencia del método de extracción de ADN que se seleccione para este fin y las muestras que, con menores intervenciones en los animales, generen los mejores resultados.

Por otro lado, los diferentes métodos anteriormente mencionados muestran resultados variables en cuanto a la eficiencia en la obtención de ADN para diferentes tipos de muestras. El método más comúnmente usado es fenol-cloroformo y en algunos casos la extracción con kit comercial como QUIAGEN®; sin embargo, ha sido ampliamente documentado que el método de fenol-cloroformo aunque es simple y eficiente, tiene componentes muy tóxicos para los investigadores y el ambiente (Silva et al., 2013).

Existen otros métodos de extracción que toman provecho de ciertas capacidades de algunos materiales para absorber el ADN y tienen importantes ventajas que evitan la degradación química y física del ADN durante la purificación, haciendo al ADN menos susceptible a la degradación enzimática y maximizando la degradación de proteínas (contaminantes) (Tian et al., 2000). Por ejemplo, los kits de extracción basados en tecnologías de sílica, son un método con una buena relación entre costos y resultados, con un proceso de extracción orgánica fácil y rápida (Liu et al., 2016). Otra técnica ampliamente usada es la separación por resinas magnéticas, este es un método rápido que

puede ser automatizado y puede ser un poco más costoso que el anterior (Dhaliwal, 2020).

Dada la relevancia de los xenartros en el neotrópico y el creciente interés en estudios de genética molecular, en esta investigación se compararon dos métodos de extracción de ADN, separación magnética con el kit PrepFiler™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) y un método basado en sílica con el kit GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.), para 5 tipos de muestras: sangre, tejido, saliva, pelos y heces o frotis anales. El objetivo del estudio fue seleccionar el mejor método de extracción, en términos de pureza, calidad e integridad de ADN, en combinación con el tipo de muestras menos invasiva posible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras provienen de animales de diferentes regiones de Colombia, que se encontraban en la fundación AIUNAU, institución localizada en Caldas, Antioquia, Colombia, la cual se encarga de su proceso de rehabilitación y reintroducción a la vida silvestre; allí se desarrolló el protocolo de muestreo. Todo el material biológico recolectado está amparado por el permiso otorgado por la autoridad nacional de licencias ambientales (ANLA) a la universidad CES, resolución 790 de 2014 y una vez concluida la investigación las muestras fueron depositadas en la colección biológica CBUCES-L (constancia de depósito 114) con registro nacional de colecciones 209; además, el proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la universidad CES en acta No 7 del 19 de enero de 2018.

Se obtuvieron muestras de sangre, tejido, saliva, pelos y heces o frotis anales de 29 individuos distribuidos en cuatro especies del superorden Xenarthra: *Myrmecophaga tridactyla* ($n = 2$), *Tamandua mexicana* ($n = 5$), *Bradypus variegatus* ($n = 3$) y *Choloepus hoffmanni* ($n = 19$). Para la toma de la muestra se siguió el siguiente protocolo:

Sangre: esta solo se obtuvo de 14 animales, de dos especies *T. mexicana* y *C. hoffmanni*, que murieron

durante el proceso de rehabilitación o que llegaron muertos a la fundación AIUNAU; a cada animal se le tomó una muestra de 5 mL de sangre en tubo con anticoagulante EDTA y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento (Muñoz-García et al., 2016).

Tejidos: hace referencia a muestras diferentes a sangre y pelos, por ejemplo: músculo, intestino, pulmón, corazón, entre otros; como en el caso anterior, solo se tomó de animales muertos e inmediatamente después del fallecimiento; se tomaron muestras a 11 animales de las especies *T. mexicana*, *B. variegatus* y *C. hoffmanni*, de aproximadamente 1 cm² de hígado, pulmón o intestino. Las muestras fueron almacenadas en un tubo eppendorfs a -20°C hasta su procesamiento (Muñoz-García et al., 2016).

Saliva: se colocó un hisopado estéril en la boca del animal permitiendo que lo masticara, igualmente se frotó contra las paredes internas de la cavidad oral (Gallina y López González, 2011). Las muestras siempre se tomaron en la mañana antes de la alimentación, después los hisopos se dejaron secar a temperatura ambiente, se empacaron en bolsas de papel y plásticas y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. En este caso, las muestras fueron recolectadas en 18 animales de las especies *M. tridactyla*, *T. mexicana*, *B. variegatus* y *C. hoffmanni*.

Pelos: estas muestras fueron tomadas a 14 animales vivos y muertos de las especies *M. tridactyla*, *B. variegatus* y *C. hoffmanni*; los animales fueron inmovilizados mecánicamente y se arrancó, aproximadamente, entre 20-30 pelos que tuvieran el folículo capilar y se almacenaron en bolsas de papel y plásticas a temperatura ambiente (Gallina y López González, 2011).

Heces/frotis anales: estas muestras se recolectaron de cuatro animales vivos de las especies *M. tridactyla* y *C. hoffmanni*; las muestras se tomaron en su encierro de rehabilitación justo después de su deposición; entre 3-4 excretas se tomaron por animal con guantes estériles y se depositaron en bolsas de papel y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento (Gallina y López González, 2011). En algunos casos se procedió a realizar frotis anal directamente en el

animal con el uso de un hisopo húmedo.

Extracción de ADN

Para probar los kits de extracción de ADN (PrepFiler™ and GeneJET™), las muestras biológicas usadas fueron: 60 μL de sangre, medio hisopo con saliva, 20 mg de tejido macerado, ocho cabellos o un hisopo impregnado de heces.

El kit de extracción PrepFiler™ (cat. 4463351) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) fue usado siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones como se describe a continuación: el proceso de lisis celular para sangre, saliva y heces fue realizado usando 300 μL de búfer de lisis para muestras biológicas e incubado a 70°C por 20 min para sangre y 40 min para saliva y heces con agitación y vórtex; para las muestras de tejidos y pelos, la digestión se hizo acorde al protocolo descrito previamente por Loreille et al. (2007) usando 180 μL de búfer de digestión y 5 μL de proteinasa K con incubación a 56°C de 10-12 h. Una vez se obtuvo el ADN, este se almacenó a 4°C y una vez se terminaron los análisis, se almacenó a -20°C en las colecciones biológicas de la universidad CES (CBUCES).

La extracción con GeneJET™ (cat. K0722) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones que se describen a continuación: la lisis celular se realizó adicionando 200 μL de la solución de lisis para muestras biológicas e incubadas a 56°C por 10 min con agitación y vórtex. Las muestras de saliva y heces fueron sumergidas en solución de lisis por 20 min e incubadas por 15 min a 56°C con agitación y vórtex; los tejidos y los pelos fueron digeridos siguiendo el protocolo de Loreille et al. (2007) descrito previamente.

Concentración integridad y pureza del ADN

Una vez el material genético fue obtenido, se determinó la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y se cuantificó la pureza por espectrofotometría usando un nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S). Considerando que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requiere de 100-200 ng de ADN, las concentraciones iguales o superiores a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ se conside-

raron óptimas. La relación de absorbancia 260/280 fue considerada para evaluar la pureza, donde una razón entre 1,8-2,0 se considera como un indicador de pureza, valores inferiores o superiores son indicios de contaminación con residuos orgánicos o inorgánicos como proteínas o solventes (Alejos-Velázquez et al., 2014). La integridad del ADN se evaluó a través de una electroforesis en agarosa al 1% teñida con SYBR™ Safe (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo a 80V por 30 min y la visualización se realizó con luz ultravioleta (UV) en un foto-documentador BIO-RAD ChemiDoc™ MP; se usó un marcador de peso molecular 50 pb (Bioline, U.S). Se consideró una integridad óptima cuando la banda de ADN tenía alto peso molecular (mayor a 2000 pb).

Análisis estadístico

Para comparar la cantidad y pureza del ADN, entre los métodos de extracción y los diferentes tipos de muestras, se utilizó un análisis de varianza de efectos mixtos con dos factores fijos (el método de extracción y el tipo de muestra) y con el individuo como factor aleatorio. Se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar las diferencias específicas entre medias (concentración de ADN y pureza). Todas las pruebas fueron realizadas con un nivel de significancia del 5%. La cantidad de ADN fue transformada con el logaritmo natural para asegurar una distribución aproximadamente normal y los resultados para esta variable se reportaron en dicha escala. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico R (Core Team, 2008).

RESULTADOS

Concentración del ADN

La concentración de ADN obtenida, usando los kits PrepFiler™ y GeneJET™, presentó diferencias entre ellos y los resultados se muestran en la figura 1 (ANOVA, $F_{4,110} = 4,35$; $p = 0,0026$). La concentración media más alta de ADN (5,25 $\text{ng}/\mu\text{L}$) fue obtenida de muestras de tejido con el kit PrepFiler™ y la más baja concentración con muestras de pelo con el kit GeneJET™ kit (1,37 $\text{ng}/\mu\text{L}$) (tabla 1). Se encontraron diferencias (prueba Tukey, $p < 0,0001$) entre muestras de tejido y sangre y muestras de tejido

y pelo con el kit PrepFiler™; mientras que con el kit GeneJET se observaron diferencias (prueba Tukey, $p < 0,0001$) entre muestras de tejidos y heces y muestras de tejido y cabello (figura 1).

Pureza del ADN

La variación obtenida en cuanto a la pureza del ADN se muestra en la figura 2 (ANOVA, $F_{4,110} = 4,12$; $p = 0,0038$). La pureza más alta fue obtenida para muestras de tejido con el kit PrepFiler™ y la más baja con el kit GeneJET™ en muestra de pelo (tabla 2). Se encontraron diferencias (Prueba de Tukey, $p < 0,0001$) con el kit PrepFiler™ entre muestras de tejido y pelos y entre saliva y pelos. Por otro lado, las diferencias observadas con el kit GeneJET™ fueron entre las muestras de tejido y cabello, tejido y heces, saliva y heces, sangre y cabello, y heces y cabello (figura 2).

Integridad del ADN

La integridad del ADN fue analizada por electroforesis al 1%; en la figura 3 se muestra el patrón electroforético obtenido del ADN de los cinco tipos de muestras, con los dos métodos de extracción empleados. Se obtuvo ADN de diferentes pesos moleculares (50 - >2000pb), con variación entre muestras y métodos de extracción. Para el método de extracción GeneJET™ (figura 3A), se obtuvieron bandas bien definidas para las muestras de saliva, sangre y tejidos, pero no se observaron resultados para heces y pelo; por otro lado, con el método de extracción PrepFiler™ (figura 3B), se observaron bandas en todos los tipos de muestras, pero las mismas evidencian un proceso de fragmentación, lo que sugiere degradación en el ADN obtenido.

DISCUSIÓN

La aplicación de técnicas moleculares comienza con la extracción de ADN a partir de muestras adecuadas. El éxito en la obtención de resultados confiables y reproducibles depende en gran medida de la obtención de un ADN de alta calidad. Esta calidad es determinada por el tipo de muestra, su manipulación, almacenamiento y el método de extracción de ADN usado. Aunque la cantidad de ADN de un organismo

Tabla 1. Media de la concentración de ADN (transformada con un logaritmo) y su desviación estándar (DS) obtenido a través de los métodos de extracción de ADN PrepFiler™ and GeneJET™

Muestra	Concentración de ADN (ng/ μ l) (Media \pm EE)	
	Kit PrepFiler™	Kit GeneJET™
Tejido (n = 12)	5,25 \pm 0,39	2,89 \pm 0,14
Saliva (n = 18)	3,56 \pm 0,24	2,54 \pm 0,24
Sangre (n = 14)	2,44 \pm 0,40	2,53 \pm 0,23
Heces (n = 4)	2,81 \pm 0,34	1,94 \pm 0,11
Pelos (n = 14)	2,20 \pm 0,20	1,37 \pm 0,08

n = número de muestras

Tabla 2. Medias de la Pureza A260/280 nm del ADN con su error estándar (DS) obtenido mediante los métodos de extracción con el kit PrepFiler™ y el kit GeneJET™

Muestra	Pureza de ADN (Media \pm EE)	
	Kit PrepFiler™	Kit GeneJET™
Tejido (n = 12)	1,87 \pm 0,04	1,77 \pm 0,04
Saliva (n = 18)	1,85 \pm 0,04	1,61 \pm 0,06
Sangre (n = 14)	1,55 \pm 0,11	1,72 \pm 0,05
Heces (n = 4)	1,59 \pm 0,15	1,46 \pm 0,04
Pelos (n = 14)	1,48 \pm 0,04	1,19 \pm 0,03

es igual y constante a través de sus células, la cantidad que se puede extraer difiere ampliamente entre los tipos de muestras (González y Martínez, 2001).

Un método de extracción de ADN ideal es corto, con un número mínimo de pasos y con reactivos que no sean nocivos para los investigadores y el ambiente (Osorio et al., 2009); en este sentido, los métodos que usan esferas magnéticas (PrepFiler™) y membranas de sílice (GeneJET™) ofrecen simplicidad y rapidez en su implementación.

Los resultados de este estudio muestran que la extracción con PrepFiler™ tiene mayores concentra-

ciones de ADN y pureza para todas las muestras empleadas; este resultado es comparable con la validación realizada por Brevnov et al. (2009) donde la calidad de ADN obtenida de saliva y sangre fue adecuada para la aplicación posterior de técnicas como PCR. Sin embargo, el protocolo de este kit incluye mucha manipulación y lavados de las muestras, lo cual explica la baja integridad observada con respecto a los resultados obtenidos con GeneJet™ (figura 3). Por otro lado, el método de extracción GeneJet™ consigue purificar un ADN menos fragmentado, pero la concentración y la pureza es menor que la obtenida con PrepFiler™; sin embargo, GeneJet™ ha sido probado con muestras tan complejas como restos óseos y tejido de insectos (Pérez et al., 2016) mostrando que tiene alta capacidad de recuperar ADN funcional.

Con respecto a la eficiencia de las muestras usadas,

el método de extracción PrepFiler™ recuperó la más alta concentración de ADN, la más alta pureza y mostró la menor degradación a partir de tejido; además, hubo diferencia en la concentración de ADN con otras muestras comúnmente usadas como sangre y pelos. Como esta muestra solo se tomó de animales muertos, se infiere que no está disponible en el trabajo rutinario con animales vivos, dado que su obtención causa gran dolor y estrés.

Un aspecto importante a considerar es el bienestar del animal; la obtención de muestras para estudios genéticos requiere captura, inmovilización e invasión del animal, causando estrés y estados de sufrimiento, que pueden desencadenar reacciones sistémicas que lleven a la muerte del animal (Valdespino et al., 2007), por lo que es recomendable buscar alternativas mínimamente invasivas.

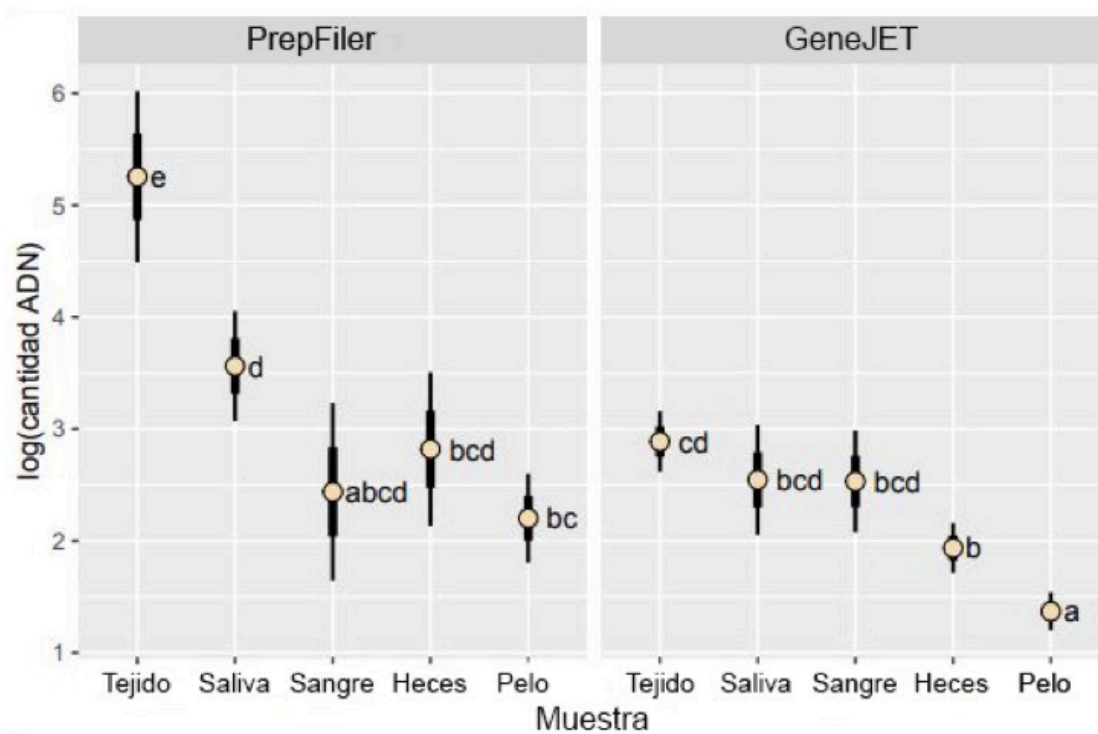


Figura 1. Concentración de ADN (log media transformado) usando los métodos PrepFiler™ (izquierda) y GeneJET™ (derecha) a través de las cinco muestras biológicas ensayadas. Los grupos de muestras identificadas con la misma letra no muestran diferencias con la prueba de Tukey's test ($\alpha = 0,05$). Las barras de error gruesas indican \pm error estándar, y las barras delgadas (más amplias) indican un intervalo de confianza del 95%.

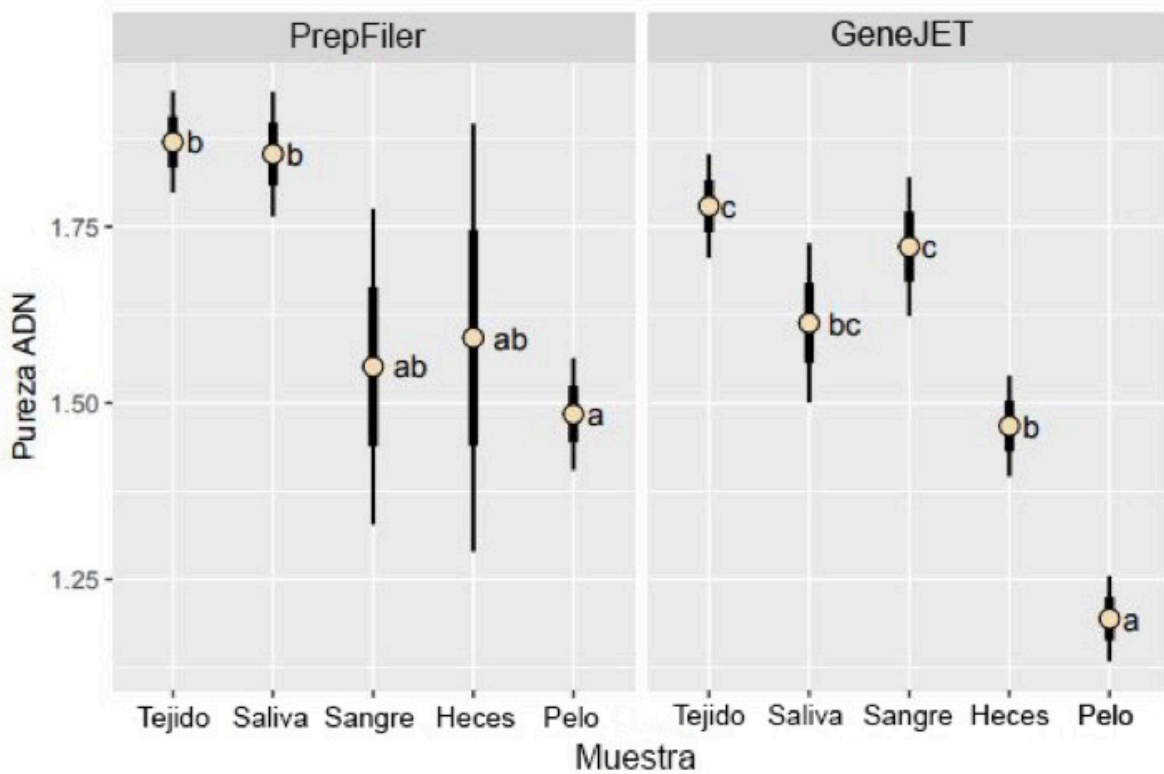
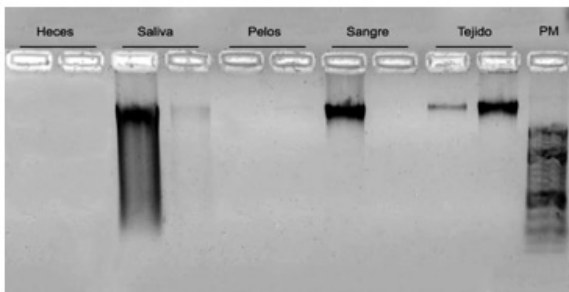


Figura 2. Medias de la pureza del ADN (izquierda: kit PrepFiler™; derecha: kit GeneJET™). Grupos con la misma letra no resultaron diferentes en la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las barras de error gruesas indican \pm error estándar y las barras delgadas (más amplias) indican un intervalo de confianza del 95%.

A.



B.

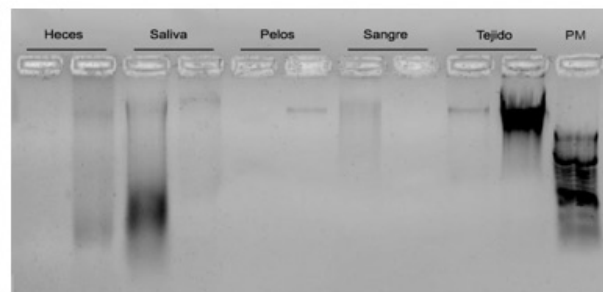


Figura 3. Integridad de ADN evaluada en gel de agarosa al 1% obtenido por (A) kit GeneJET™ y (B) kit PrepFiler™. Se muestran dos resultados representativos escogidos al azar para cada tipo de muestra y acompañados por un marcador de peso molecular (PM) de 50 pb.

Por lo tanto, a fin de garantizar el bienestar animal, el trabajo científico requiere la búsqueda de otros métodos, independiente del costo o la conveniencia (Jar, 2014). Los métodos mínimamente invasivos pueden ser los de elección en muchos estudios de monitoreo

genético en vertebrados. La principal razón es que se pueden obtener muestras de ADN de animales en libertad y ser usadas para identificar individuos a través del espacio y el tiempo y generar datos genéticos sin necesidad de atraparlos, manipularlos y en algunos casos observarlos (Beja et al., 2009; Carroll et al., 2018; Schwartz et al., 2007). Por esta razón, se probaron muestras como pelos, saliva y heces, las cuales son fáciles y rápidas de obtener y requieren un contacto mínimo con el animal; estas muestras han sido útiles en proveer información genética de un gran rango de especies con altos niveles de individualización (Taberlet et al., 1999).

De las fuentes mínimamente invasivas probadas en este estudio, la obtención de ADN de saliva fue una de las que mostró mejores resultados, en particular cuando se usa el método de extracción PrepFiler™, el cual no mostró diferencias significativas en cuanto a pureza, concentración e integridad cuando se compara con las muestras de sangre. Este mismo resultado fue obtenido por Abraham et al. (2012), donde concluyen que, en muchos casos, la saliva puede reemplazar la muestra de sangre en muchos procedimientos para obtención de ADN. Por otro lado, la muestra de saliva también presentó mejores valores de calidad con respecto a pelo, una muestra que es comúnmente usada en estudios de este tipo en el superorden Xenarthra (Coimbra et al., 2017).

Por otro lado, cabe mencionar que los resultados de ADN obtenidos de heces cuando se usa el método de extracción de ADN PrepFiler™, mostraron niveles de concentración y pureza similares a los obtenidos de sangre y pelos (sin diferencia significativa), por lo cual se podría considerar el uso de esta muestra, que no es comúnmente empleada como fuente de ADN en este clado; apoyando esta idea, Chiu y Bergey (2017) concluyeron que las heces son una fuente importante y confiable de ADN para estudios moleculares en animales salvajes. Sin embargo, aquí no analizamos suficientes muestras de heces para

sacar una conclusión confiable sobre este tipo de muestra, por lo que recomendamos reconsiderarlo y volver a estudiarlo en futuras investigaciones.

Estos resultados permiten orientar los estudios genéticos y mejorar las metodologías de toma de muestra y obtención de ADN en los Xenarthra, evitando protocolos como los descritos por Barros et al., (2003) y Miranda et al., (2017), dado que se demuestra que hay otras fuentes de ADN que no requieren la muerte o una intervención mayor de los animales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estos estudios permiten concluir que la saliva es una muestra mínimamente invasiva que permite obtener ADN de muy buena calidad y cuyo uso con métodos como PrepFiler™ facilita su extracción y purificación. En conclusión, usar muestras de saliva y métodos de extracción de ADN como los descritos, es recomendable para la obtención de ADN en los xenartros bajo estudio. La obtención de ADN a partir de tejidos es una excelente fuente de ADN, pero se sugiere que solo sea usada en casos de contar con animales muertos.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se llevó a cabo dentro del convenio marco entre la Universidad CES y la fundación AIUNAU. Los investigadores agradecen a la universidad CES por financiar este proyecto y por permitirles el uso de los laboratorios. También extienden los agradecimientos a los auxiliares de laboratorio Diana Carmona y Sergio Álzate por su acompañamiento y a la fundación AIUNAU por proveer las muestras y por su activa participación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los investigadores refieren no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abba, A. M., & Superina, M. (2010). The 2009/2010 Armadillo Red List Assessment. *Edentata*, 11(2), 135-184. DOI:10.5537/020.011.0203
- Abba, A. M., Tognelli, M. F., Seitz, V. P., Bender, J. B., & Vizcaíno, S. F. (2012). Distribution of extant xenarthrans (Mammalia: Xenarthra) in Argentina using species distribution models. *Mammalia*, 76(2). DOI:10.1515/mammalia-2011-0089
- Abraham, J. E., Maranian, M. J., Spiteri, I., Russell, R., Ingle, S., Luccarini, C., Earl, H. M., Pharoah, P. P., Dunning, A. M., & Caldas, C. (2012). Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Medical Genomics*, 5, 19. DOI:10.1186/1755-8794-5-19
- Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. C., & Cornejo-Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. G. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-26). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Avise, J. C. (1989). A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(9), 279-281. DOI:10.1016/0169-5347(89)90203-6
- Barros, M. C., Sampaio, I., & Schneider, H. (2003). Phylogenetic analysis of 16S mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1), 5-11. DOI:10.1590/S1415-47572003000100002
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K., & Luikart, G. (2009). Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1279-1301. DOI:10.1111/j.1755-0998.2009.02699.x
- Blanco Jarvio, A., Martínez López, A., & Bautista García, A. (2014). Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. *CICIMAR Oceanides*, 29(2), 37-44. DOI:10.37543/oceanides.v29i2.138
- Brevnov, M. G., Pawar, H. S., Mundt, J., Calandro, L. M., Furtado, M. R., & Shewale, J. G. (2009). Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *Journal of Forensic Sciences*, 54(3), 599-607. DOI:10.1111/j.1556-4029.2009.01013.x
- Carroll, E. L., Bruford, M. W., DeWoody, J. A., Leroy, G., Strand, A., Waits, L., & Wang, J. (2018). Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evolutionary Applications*, 11(7), 1094-1119. DOI:10.1111/eva.12600
- Coimbra, R. T. F., Miranda, F. R., Lara, C. C., Schetino, M. A. A., & Santos, F. R. D. (2017). Phylogeographic history of South American populations of the silky anteater *Cyclopes didactylus* (Pilosa: Cyclopedidae). *Genetics and Molecular Biology*, 40(1), 40-49. DOI:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0040
- Core Team. (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.r-project.org/>
- Dhaliwal, A. (2020). DNA Extraction and Purification. *Materials and Methods*. DOI:10.13070/mm.en.3.191
- Gallina, S., & López-González, C. (2011). *Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna silvestre*. Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de Ecología. http://www1.inecol.edu.mx/cv/CV_pdf/libros/tecnicas_fauna.pdf.
- Gardner, A. L. (2008). *Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. University of Chicago Press. DOI:10.7208/chicago/9780226282428.001.0001
- Gaudin, T. (2003). Phylogeny of the Xenarthra (Mammalia). *Senckenbergiana biologica*, 83, 27-40. [http://www.saturnia.de/senck-biol/sebio-cont.htm#83%20\(1\)](http://www.saturnia.de/senck-biol/sebio-cont.htm#83%20(1))
- Gibb, G. C., Condamine, F. L., Kuch, M., Enk, J., Moraes-Barros, N., Superina, M., Poinar, H. N., & Delsuc, F. (2016). Shotgun mitogenomics provides a reference phylogenetic framework and timescale for living Xenarthrans. *Molecular Biology and Evolution*, 33(3), 621-642. DOI:10.1093/molbev/msv250
- González Andrade, F., Martínez Jarreta, M. B., & Institución Fernando el católico. (2001). *Técnicas instrumentales en genética forense*. Institución Fernando el católico. <http://77ifv.dpz.es>.
- Jar, A. M. (2014). Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 77-79. DOI:10.1016/S0325-7541(14)70051-3
- Liu, L., Zilong, G., Huang, Z., Zhuang, J., & Yang, W. (2016). Size-selective separation of DNA fragments by using lysine-functionalized silica particles. *Scientific Reports*, 6, 22029. DOI:10.1038/srep22029
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191-195. DOI:10.1016/j.fsigen.2007.02.006
- Muñoz-García, C., Rendón-Franco, E., López-Díaz, O., Ruiz Romero, R., Arechiga-Ceballos, N., Villanueva, C., Rodas-Martínez, A., Valle-Lira, M., Trillanes, C., & Arellano-Aguilar, O. (2016). *Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo*. Editorial universidad autónoma metropolitana de Xochimilco https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/colecta_fauna_silvestre.pdf
- Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 125-131. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10339/10834>
- Pérez, L. A., Rodríguez, F., Langebaek, C. H., & Groot, H. (2016). Real-time quantification to analyze historical Colombian samples detecting a short fragment of hypervariable region II of mitochondrial DNA. *Biomédica*, 36(3), 475-482. DOI:10.7705/biomedica.v36i3.3098

- Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1), 25-33. DOI:10.1016/j.tree.2006.08.009
- Silva, P., Manganiello, L., Mendoza, N., & Vega, C. (2013). Método rápido para la determinación de fenol y pentaclorofenol en agua potable mediante HPLC con detección UV. *Ingeniera UC*, 20(3), 9. <https://www.redalyc.org/pdf/707/70732641010.pdf>
- Taberlet, P., Waits, L. P., Luikart, G., Taberlet, P., Waits, L. P., Luikart, G., Taberlet, P., Waits, L. P., Luikart, G., Taberlet, P., Waits, L. P., & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8), 323-327. DOI:10.1016/S0169-5347(99)01637-
- Tian, H., Hühmer, A. F. R., & Landers, J. P. (2000). Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Analytical Biochemistry*, 283(2), 175-191. DOI:10.1006/abio.2000.4577
- Valdespino, C., Martínez-Mota, R., García-Feria, L. M., & Martínez-Romero, L. E. (2007). Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evolución de una metodología no invasiva. *Acta Zoológica Mexicana (N. S.)*, 23(3), 151-180. DOI:10.21829/azm.2007.233605
- Wilson, D. E., & R. A., Mittermeier (Eds.). (2018). *Handbook of the Mammals of the World Vol.8: Insectivores, Sloths and Colugos*. Lynx Editions. <https://www.iberlibro.com/Handbook-Mammals-World-Vol.8-Insectivores-Sloths/30104586229/bd>